SNI

Standar Nasional Indonesia

SNI 7768:2013

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Pakan buatan untuk pembesaran ikan bawal air tawar (*Colossoma macropomum*)

ICS 65.120

Badan Standardisasi Nasional

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi i
Prakata ii
1 Ruang lingkup 1
2 Acuan normatif 1
3 Istilah dan definisi 1
4 Klasifikasi 2
5 Syarat mutu 2
6 Pengambilan contoh 2
7 Cara uji dan pengukuran 3
8 Syarat penandaan dan pengemasan 4
Lampiran A (normatif) Penentuan nitrogen bebas 5
Lampiran B(normatif) Penetapan residu antibiotik oxy*tetracycline* dengan metode*ELISA* 6
Lampiran C (normatif)Penetapan residu antibiotik *chloramphenicol* (CAP) dengan menggunakan metode kromatografi cair tandem massa spektrometri (LC-MSMS) 9
Lampiran D (normatif)Penetapan residu antibiotik chloramphenicol dengan metode kromatografi gas tandem mass spektrometri (GC-MSMS) 12
Lampiran E (normatif)Penetapan residu antibiotik nitrofuran dan derivatnya dengan menggunakan metode kromatografi cair tandem massa spektrometri (LC-MSMS) 14
Lampiran F (normatif)Penetapan kadar melamin dengan menggunakan metode ELISA 17
Lampiran G (normatif)Penetapan aflatoksin dengan menggunakan metode ELISA 19
Bibliografi 21

Tabel 1 - Syarat mutu pakan ikan bawal air tawar 2

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2013

Prakata

Standar ini disusun agar dapat digunakan oleh pembudidaya, pelaku usaha dan instansi lainnya yang memerlukan serta digunakan untuk pembinaan mutu dalam rangka sertifikasi.

Standar ini disusun sebagai pedoman untuk pembuatan pakan yang memenuhi persyaratan mutu pakan dalam upaya meningkatkan jaminan mutu dan keamanan hasil perikanan.Pakan merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan usaha pembudidayaan ikan sehingga perlu dijamin ketersediaannya sesuai jumlah dan mutu yang dibutuhkan, untuk itu diperlukan persyaratan teknis tertentu.

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis (SPT) 65-05-S2 Perikanan Budidaya dan telah dibahas dalam rapat teknis dan terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 6 Oktober 2011 di Bogor, dengan memperhatikan:

1. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Nomor:PER.02/MEN/2010 tentang Pengadaan dan Peredaran Pakan Ikan.
2. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Nomor: PER.19/MEN/2010tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.
3. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Nomor: PER.02/MEN/2007 tentang Monitoring Residu Obat, Bahan Kimia, Bahan Biologi dan Kontaminan pada Pembudidayaan Ikan.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Nomor: KEP.02/MEN/2007 tentang Cara Budidaya Ikan yang Baik.
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Nomor: KEP.01/MEN/2007 tentang Persyaratan Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan pada Proses Produksi, Pengolahan dan Distribusi.
6. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Nomor: KEP.20/MEN/2003 tentang Klasifikasi Obat Ikan.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 7 Februari 2012 sampai 6 Mei 2012 dengan hasil akhir RASNI.

.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Pakan buatan untuk pembesaran ikan bawal air tawar (*Colossoma macropomum*)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan klasifikasi, syarat mutu, cara uji dan pengukuran, syarat penandaan dan cara pengemasan pakan buatan untuk pembesaran ikan bawal air tawar (*Colossoma macropomum*).

2 Acuan normatif

Acuan ini merupakan dokumen yang digunakan dari standar ini. Untuk acuan bertanggal, edisi yang berlaku sesuai yang tertulis. Sedangkan untuk acuan tidak bertanggal berlaku edisi yang terakhir (termasuk amandemen).

SNI 2326:2010, *Metode pengambilan contoh pada produk perikanan*.

SNI 01-2332.2-2006, *Cara uji mikrobiologi - Bagian 2: Penentuan Salmonella pada produk perikanan.*

SNI 2354.1:2010, *Cara uji kimia- Bagian 1: Penentuan kadar abu dan abu tak larut dalam asam pada produk perikanan.*

SNI 01-2354.2-2006, *Cara uji kimia - Bagian 2: Penentuan kadar air pada produk perikanan*.

SNI 01-2354.3-2006, *Cara uji kimia - Bagian 3: Penentuan kadar lemak total pada produk perikanan*.

SNI 01-2354.4-2006, *Cara uji kimia - Bagian 4: Penentuan kadar protein dengan metode total nitrogen pada produk perikanan*.

SNI 2891, *Cara uji makanan dan minuman.*

SNI 7587.1:2010, *Metode uji residu antibiotik secara enzyme linked immunoassay (ELISA) pada ikan dan udang – Bagian 1: Semicarbazide (SEM).*

SNI 7587.2:2010, *Metode uji residu antibiotik secara enzyme linked immunoassay (ELISA) pada ikan dan udang – Bagian 2: Aminohydantoin (AHD).*

SNI 7587.3:2010, *Metode uji residu antibiotik secara enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) pada ikan dan udang - Bagian 3: Chloramphenicol (CAP).*

SNI 7587.4:2010, *Metode uji residu antibiotik secara enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) pada ikan dan udang - Bagian 4: Metabolit Furazolidone (AOZ).*

SNI 7587.5:2010, *Metode uji residu antibiotik secara enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) pada ikan dan udang - Bagian 5: Metabolit Furaltadone (AMOZ).*

3 Istilah dan definisi

3.1
ikan bawal air tawar
jenis ikan air tawar omnivore yang secara taksonomis adalah spesies *Colossoma macropomum* hasil introduksi dari Amerika Selatan yang telah didomestikasi memiliki bentuk pipih membulat dengan warna dasar hitam keabu-abuan, ciri khas warna merah pada perut bagian depan

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

3.2
pakan buatan
campuran dari berbagai bahan baku pakan yang diformulasikan dengan kandungan nutrisi tertentu dan kebutuhan gizi ikan, tidak mengandung zat atau senyawa yang dapat menimbulkan gangguan kesehatan pada ikan bawal air tawar serta memenuhi persyaratan keamanan pangan dan lingkungan

3.3
pendederan
rangkaian kegiatan pemeliharaan benih bawal air tawar dari ukuran minimal 2,5 cm hingga mencapai ukuran 5 cm sampai dengan 8 cm

3.4
pembesaran
rangkaian kegiatan pemeliharaan ikan bawal dengan berukuran minimal 5 cm hingga mencapai ukuran konsumsi antara 300 gram sampai dengan 500 gram

4 Klasifikasi

Digolongkan menjadi 1 (satu) tingkatan mutu.

5 Syarat mutu

Persyaratan mutu pakan ikan bawal air tawar sesuai dengan Tabel 1

Tabel 1 - Syarat mutu pakan ikan bawal air tawar

No.	Parameter	Satuan	Tahapan pemeliharaan	
			Pendederan	Pembesaran
1	Kadar air	%	maks.12	maks.12
2	Kadar abu	%	maks.12	maks.12
3	Kadar protein	%	min. 30	min. 24
4	Kadar lemak	%	min. 6	min. 5
5	Kadar serat kasar	%	maks. 6	maks. 10
6	Nitrogen bebas(N_2 bebas)	%	maks. 0,20	maks. 0,20
7	Diameter pakan	mm	Maks. 2	2 - 4
8	Kandungan cemaran mikroba/toksin : - *salmonella* - aflatoksin	 kol/g µg/kg	 Negatif maks.50	 Negatif maks. 50
9	Kandungan antibiotik	µg/kg	ttd	ttd
10	Kandungan melamin	µg/kg	ttd	ttd
CATATAN : nilai pada tabel ini berdasarkan pada kondisi pakan apa adanya (*as fed*)				

6 Pengambilan contoh

Sesuai dengan SNI 2326:2010.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

7 Cara uji dan pengukuran

7.1 Cara uji kimia

7.1.1 Kadar air, sesuai dengan SNI 01-2354.2-2006.

7.1.2 Kadar abu total, sesuai dengan SNI 01-2354.1-2006.

7.1.3 Penentuan lemak total,sesuai dengan SNI 01-2354.3-2006.

7.1.4 Kadar protein, sesuai dengan SNI 01-2354.4-2006.

7.1.5 Kadar serat kasar, sesuai dengan SNI 2891.

7.1.6 Penentuan nitrogen bebas dengan menggunakaan metode pengukuran nitrogen bebas, sesuai dengan Lampiran A.

7.1.7 Penetapan antibiotik Oxy*tetracycline*.

Penetapan antibiotic Oxy*tetracycline* dengan metode *ELISA*, sesuai Lampiran B.

7.1.8 Penetapan residu antibiotik *chloramphenicol* (CAP)

7.1.8.1 Penetapan residu antibiotik *chloramphenicol* (CAP) dengan menggunakan metode *ELISA*, sesuai dengan SNI 7587.3:2010.

7.1.8.2 Penetapan residu antibiotik *chloramphenicol* (CAP) dengan menggunakan metode kromatografi (LC-MSMS dan GC-MSMS), sesuai dengan Lampiran C dan D

7.1.9 Penetapan residu antibiotik*nitrofuran*

7.1.9.1 Penetapan residu antibiotik *Furazolidone* (AOZ) dengan menggunakan metode *ELISA*, sesuai dengan SNI 7587.4:2010.

7.1.9.2 Penetapan residu antibiotik *Furaltadone*(AMOZ) dengan menggunakan metode *ELISA*, sesuai SNI 7587.5:2010.

7.1.9.3 Penetapan residu antibiotik *Semicarbazide* (SEM) dengan menggunakan metode ELISA, sesuai dengan SNI 7587.1:2010.

7.1.9.4 Penetapan residu antibiotik *Aminohydantoin* (AHD) dengan menggunakan metode ELISA, sesuai dengan SNI 7587.2:2010.

7.1.9.5 Penetapan residu antibiotik nitrofuran dan derivatnya dengan menggunakan metode LC-MSMS, sesuai Lampiran E

7.1.10 Penetapan kadar melamin dengan menggunakan metode ELISA, sesuai Lampiran F.

7.2 Cara uji cemaran mikroba/toksin

7.2.1 Penentuan *Salmonella*, sesuai SNI 01-2332.2-2006.

7.2.2 Penentuan aflatoksin dengan menggunakan metode *ELISA*, sesuai Lampiran G.

7.3 Cara uji fisik pakan

Pengukuran diameter pakan diukur dengan menggunakan alat mikrometer (milimeter).

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

8 Syarat penandaan dan pengemasan

Pada kemasan dicantumkan mengikuti ketentuan yang berlaku tentang Pengadaan dan Peredaran Pakan Ikan

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Lampiran A
(normatif)
Penentuan nitrogen bebas

A.1 Prinsip

Senyawa nitrogen yang terdapat dalam contoh diuraikan oleh NaOH, kemudian amoniak yang dibebaskan diikat dengan asam borat dan dititar dengan larutan asam standar.

A.2 Peralatan

a) alat penyuling dan kelengkapannya;
b) pemanas;
c) neraca analitik.

A.3 Pereaksi

a) larutan indikator: 10 ml hijau bromkresol 0,1 % dicampur dengan 2 ml merah metil 0,1 % dalam alkohol 95 %;
b) larutan asam borat indikator : 500 ml asam borat 2 % dicampur dengan 5 ml larutan indokator;
c) larutan asam klorida, HCl 0,1 N;
d) larutan natrium hidroksida, NaOH 30 %: larutkan natrium hidroksida ke dalam 350 ml air, simpan dalam botol bertutup karet.

A.4 Cara kerja

a) Timbang seksama 5 gram cuplikan, masukkan ke dalam labu didih 250 ml, tambahkan 100 ml air suling dan 10 ml NaOH 30 %, hubungkan dengan alat penyuling.
b) Sulingkan selama lebih kurang 20 menit, sebagai penampung gunakan 10 ml larutan asam borat 2 % yang telah dicampur indikator.
c) Bilas ujung pendingin dengan air suling.
d) Titar dengan larutan HCl 0,1 N.
e) Kerjakan penetapan blanko dengan perhitungan:

$$\text{Nitrogen bebas} = \frac{(b - c) \times d \times 0{,}014}{a} \times 100\ \%$$

dengan pengertian:
a adalah bobot cuplikan (g);
b adalah volume HCl 0,1 N yang dipergunakan peniteran contoh (ml);
c adalah volume HCl 0,1 N yang dipergunakan peniteran blanko (ml);
d adalah normalitas HCl.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Lampiran B
(normatif)
Penetapan residu antibiotik oxy*tetracycline* dengan metode*ELISA*

B.1 Prinsip

Pengujian ini dilakukan dalam *microwell* dimana alat ini telah dilapisi dengan kompetitor oksitetrasiklin.Larutan standar oxy*tetracycline* atau sampel dan reseptor yang ditambahkan ke *microplate*. Selama inkubasi, kompetitor akan berikatan satu sama lain (dari ketiganya) membentuk ikatan yang kuat yang disebut dengan molekul oksitetrasiklin. Dengan pencucian, molekul yang tidak berikatan akan terbuang. Selama inkubasi kedua receptor yang telah berikatan kuat akan diikat kembali oleh antireceptor (HRP *ConjugateAntibodi*). Setelah pencucian kedua, ikatan antara receptor dengan konjugate antibody ditandai dengan pewarnaan substrat. Enzim akan bereaksi dan menghasilkan warna biru. Dengan penambahan *stop* reagen menghasilkan perubahan warna dari biru ke kuning. Intensitas warna yang dihasilkan akan berbanding terbalik dengan konsentrasi oksitetrasiklin pada sampel.

B.2 Peralatan

a) *mikrotiter plate reader* (450 nm);
b) neraca analitik;
c) inkubator;
d) *blender* (*homogenizer*);
e) *sentrifus*;
f) *vortex*;
g) micropipette berbagai volume;
h) multi *channel* pipet;
i) reapete pipet
j) tabung centrifuse;
k) pH meter, kertas pH.

B.3 Pereaksi

a) *oxytetracycline* kompetitor dalam *mikrotiter plate* (48 *well plate*);
b) standar oksitetrasiklin225 ng;
c) *100 x HRP conjugate antibody #2*;
d) *Antibody #2 diluents*;
e) TMB Substrat;
f) *stop solution*;
g) Oksitetrasiklin antibody #1;
h) *washing buffer* 20x;
i) *20x TET ekstraction buffer*
j) air destilasi
k) 10 mM PBS buffer (0.24 g KH_2PO_4 + 1.44 g Na_2HPO_4 + 8 g NaCl + 0.2 g KCl, larutkan dalam 1000 ml air destilasi, pH 7,4)

B.4 Cara kerja

B.4.1 Pembuatan pereaksi

a) Preparasi standar kerja oksitetrasiklin

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Stok standar oksitetrasiklin sebesar 225 ng. Tambahkan 1.5 ml 10 mM PBS ke vial stok dan aduk dengan di vortex selama 1 menit, sehingga tersedia vial stok standar sebesar 150 ppb. Pembuatan standar kerja dilakukan dengan pengenceran dari stok standar 150 ppb :

Standar kerja	Sumber Oksitetrasiklin	Volume sumber oksitetrasiklin	Volume 10 mM PBS Buffer
4,5 ppb vial	300 ppb vial stok	30 µL	1970 µL
1,5 ppb vial	4,5 ppb vial	500 µL	1000 µL
0,75 ppb vial	1,5 ppb vial	500 µL	500 µL
0,375 ppb vial	0,75 ppb vial	500 µL	500 µL
0,15 ppb vial	0,375 ppb vial	500 µL	750 µL
Negativ Control Vial	N/A	0 µL	500 µL

b) 1x TET extraction buffer
Campurkan 1 volume *extraction buffe*r 10x dengan 9 volume air destilasi (1+9).
c) *1x HRP conjugate antibody #2*
Campurkan 1 volume 100x HRP *conjugate antibody #2* dengan 99 volume Ab#2 Diluent.
d) *Antibody #1*
Tambahkan 4,5 ml antibody#1 diluent ke dalam botol sebuk antibody#1, kocok sebanyak 10 kali, simpan pada suhu ruang selama min 15 menit (waktu inkubasi yang pendek akan menghasilkan nilai OD yang tidak stabil). Antibody dapat disimpan dalam suhu 4 °C (masa penggunaan 1 minggu) dan -20 °C (masa penggunaan 1 bulan)
e) *1x washing solution*
Campurkan 1 volume *washing buffer* 20x dengan 19 volume air destilasi (1+19).

B.4.2 Preparasi sampel:

a) Homogenkan sampel dengan blender atau sejenisnya;
b) Timbang 1 gram sampel tambahkan 4 ml 1xTET extraction buffer;
c) *Vortex* selama 10 menit atau shaker selama 30 menit;
d) Sentrifugasi pada kecepatan 4 000 rpm selama 10 menit;
e) Pindahkan 50 µL supernatan ke dalam tabung baru, kemudian tambahkan 950 µL 10 mM PBS buffer, vortex selama 30 detik
f) Gunakan 75µL untuk pengujian.

CATATAN :*Dillution factor* 100,0

B.5 Prosedur pengujian pada ELISA:

a) Tambahkan 75 µL pada masing-masing *well* yang berbeda, standar oksitetrasiklin sebanyak 2 ulangan (pemberian standar pada *plate* berurutan dari konsentrasi yang rendah sampai yang tinggi).
b) Tambahkan 75 µL sampel pada masing-masing *well* sampel.
c) Tambahkan 100 µL *antibody#1* dan aduk dengan menggoyangkan *plate* dengan pelan selama 1 menit.
d) Inkubasi selama 50 menit pada suhu ruangan (20 °C - 25°C).
e) Cuci *plate* sebanyak 3 kali ulangan dengan 250 µL 1 x *wash solution*. Setelah pencucian, balikan *plate* dan ketuk pelan-pelan pada kertas tisu kering (lakukan langkah berikutnya, segera setelah pencucian).
f) Tambahkan 150 µL larutan 1x *antibody#2*, inkubasi selama 20 menit pada suhu ruangan (20 °C- 25 °C).
g) Tambahkan 100 µL TMB substrat, reaksi terjadi sesaat setelah penambahan substrat. Aduk dengan cara menggoyangkan plate dengan pelan selama 1 menit.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

h) Inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang.
i) Tambahkan 100 µL stop buffer pada masing-masing well. Dan aduk dengan menggoyangkan plate selama beberapa detik.
j) Pembacaan plate segera setelah penambahan stop buffer. Pembacaan dilakukan pada plate *reader* dengan panjang gelombang 450 nm.

B.6 Perhitungan

a) Kurva standar dapat di bentuk dengan memplotkan (menghubungkan) nilai rata-rata relatif absorban (%) yang diperoleh atau dari referensi standar lain yang berbading terbalik dengan konsentrasi dalam µg/kg pada kurva *logarithmic*.

$$\text{Relatif absorban(\%)} = \frac{\text{Absorban standar (atau sampel) x 100}}{\text{Absorban zero standar}}$$

b) *Detection dan quatification limit* sample :

LOD = (0,05 ppb) x (dilution factor)

LOQ = (0,15 ppb) x (dilution factor)

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Lampiran C
(normatif)
Penetapan residu antibiotik *chloramphenicol* (CAP) dengan menggunakan metode kromatografi cair tandem massa spektrometri (LC-MSMS)

C.1 Prinsip

Metode ini terbagi dalam 3 tahapan :

a) Ekstraksi Kloramfenikol oleh ethyl asetat (Ekstraksi : Pemisahan zat berdasarkan kelarutan).
b) Pemurnian bahan yang sudah diekstrak dengan pemisahan cair-cair.
c) Perhitungan dan identifikasi pada system LC-MSMS.

C.2 Pereaksi

a) Ethyl asetat
b) Carbon Tetrachlorure
c) Hexane
d) Bahan Kloramphenikol (CAP)
e) Deutered Kloramphenikol (D5-CAP)
f) Air *Ultra Pure*

C.3 Peralatan

a) LC MSMS
b) Tabung sentrifuse
c) Vortex
d) Nitrogen Evaporator
e) Sentrifuse

C.4 Cara kerja

C.4.1 Pembuatan larutan standar

a) Pembuatan larutan baku kerja : Larutkan sejumlah Kloramfenikol untuk konsentrasi akhir 500 mg/l dengan cara menimbang seksama 50,0 mg baku dan dilarutkan serta diencerkan dengan air hingga 100,0 ml.
b) Pembuatan larutan standar internal (D-5 CAP) yang setara dengan 5 µg/l (ppb) (dengan melakukan pengenceran dari larutan standar), dengan cara dengan memipet 1,0 ml larutan baku persediaan yang diencerkan dengan air hingga 100,0 ml.
c) Pembuatan larutan spike sampel untuk kurva kalibrasi pada konsentrasi 0.5 µg/l (100 µl larutan baku kerja dalam 100 ml air), 1 µg/l (200 µl larutan baku kerja dalam 100 ml air), 2 µg/l (400 µl larutan baku kerja dalam 100 ml air) dan 3 µg/l (600 µl larutan baku kerja dalam 100 ml air).

C.4.2 Preparasi sampel

a) Timbang 2 g sampel ke dalam tabung sentrifuse
b) Tambahkan 0,2 ml larutan standar internal (5 µg/l) dan 0,8 ml air
c) Campurkan atau homogenkan
d) Tambahkan 6 ml Ethyl asetat
e) Kocok selama 10 menit dalam rotary stirrer dengan kecepatan 100 rpm/mnt

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

f) Sentrifuse selama 5 menit pada kecepatan 4 000 g dalam 4 °C
g) Ambil Phase atas sebanyak 5 ml ke dalam vial gelas
h) Keringkan dalam nitrogen evaporator pada suhu 40 °C
i) Larutkan residu dengan 0,5 ml iso octan
j) Tambahkan 0,5 ml air, lalu campurkan
k) Sentrifuse pada kecepatan 3 000 g selama 5 menit (buang fase atas)
l) Pindahkan fase atas ke dalam vial LC

C.4.3 *Fortifikasi*

a) Timbang 2 g sampel ke dalam tabung sentrifuse.
b) Tambahkan :
 - 0,2 ml larutan D-5 CAP (standar internal) + 0,8 ml air ultra pure ----- Sebagai Blank Sampel.
 - 0,2 ml larutan standar 0.5 µg/l, 1 µg/l, 2 µg/l dan 3 µg/l + 0,2 ml larutan D-5 CAP (standar internal) + 0,6 ml air ultra pure ----- Sebagai Spike sampel untuk kurva kalibrasi pada konsentrasi 0.05, 0.1, 0.2 dan 0.3 µg/l.
 - Langkah tersebut diatas secara rinci tersaji pada tabel.

.

Larutan Spike CAP dalam Air Ultra pure (µg/L)	**Volume Larutan Spike (µg)**	**Volume D-5 CAP (µg)**	**Volume air *ultra pure* (µg)**	**Konsentrasi spike sample pada kurva kalibrasi (µg/L)**
Blank Sampel (0.0)	0	200	800	0
0,5	200	200	600	0.05
1,0	200	200	600	0.10
2,0	200	200	600	0.20
3,0	200	200	600	0.30

c) Campurkan atau homogenkan, setelah itu diamkan selama 10 menit.
d) Lakukan langkah seperti pada metode kerja preparasi sampel tahap 4 s.d 12.

C.5 LC-MSMS *confirmation*

C.5.1 *Reagen*

a) Acetonitril
b) Ammonium Asetat 0,01 M dalam air
c) Water

C.5.2 *Kromatografi*

a) HPLC Pump
b) Automatic Injector
c) Column : Water Symmetry C 18 150 x 3.9 mm internal diameter

C.5.3 *Mass Spectrometry*

a) ESI Interfase (Applied Biosytem)
b) Mass Spectrometer API 4000 (Apllied Biosytem)
c) Data station

C.5.4 *LC Conditions*

a) Flow 0,6 ml/mn (tanpa split)

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

b) Eluant : ammonium acetate buffer 0,01 M/Acetonitril
c) Gradient :
 - T= 0 : 80/20 can
 - T= 2 mn : 40/60
 - T= 5 mn : 40/60
 - T= 6 mn : 80/20
d) Volume yang diinjek 50 µl
e) Retention time : 5.3 mn
f) *Source conditions*
 - Nebulizer gas pressure: 50 psi
 - Auxiliary gas pressure : 50 psi
 - Nebulizer Temperatur : 700°C
g) *Mass Spectrometer condition*
 - Ionisation mode : ESI negative
 - Detetction mode : MRM
 - Precursors ion Q1 321 (CAP) 323 (CAP) dan 326 (D5-CAP)
 - Products ion Q3 152 257 (CAP) 152 (CAP) dan 157 (D5-CAP)

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Lampiran D
(normatif)
Penetapan residu antibiotik chloramphenicol dengan metode kromatografi gas tandem mass spektrometri (GC-MSMS)

D.1 Prinsip

Metode ini terbagi dalam 3 tahapan :

a) *Clean up* atau prosedur pencucian dimanasampel dibersihkan dengan menggunakan C18.
b) Derivatisasi dengan menggunakan MSTFA.
c) Perhitungan dan identifikasi pada system GC-MSMS.

D.2 Pereaksi

a) Standar CAP
b) Internal Standar (D5-CAP)
c) Ethyl asetat (analitik Grade)
d) Acetonitril
e) Toluene
f) MSTFA

D.3 Cara kerja

D.3.1 Pembuatan larutan standar

a) Pembuatan larutan baku kerja : Larutkan sejumlah Kloramfenikol untuk konsentrasi akhir 500 mg/l dengan cara menimbang seksama 50,0 mg baku dan dilarutkan serta diencerkan dengan air hingga 100,0 ml.
b) Pembuatan larutan standar internal (D-5 CAP) yang setara dengan 20 µg/l (ppb) (pembuatan larutan internal standar 5 ppb dengan melakukan pengenceran).
c) Pembuatan larutan spike sampel untuk kurva kalibrasi pada konsentrasi 0.5 µg/l (100 µl larutan baku kerja dalam 100 ml air), 1 µg/l (200 µl larutan baku kerja dalam 100 ml air), 2 µg/l (400 µl larutan baku kerja dalam 100 ml air) dan 3 µg/l (600 µl larutan baku kerja dalam 100 ml air).

D.3.2 Preparasi sampel

D.3.2.1 Standar kalibrasi dan internal standar

a) Timbang 5 g sampel blank (tidak mengandung residu) ke dalam tabung sentrifuse.
b) Tambahkan :
 - 0,2 ml larutan D-5 CAP (standar internal) + 0,8 ml air ultra pure ----- Sebagai Blank Sampel.
 - 0,2 ml larutan standar 0.5 µg/l, 1 µg/l, 2 µg/l dan 3 µg/l + 0,2 ml larutan D-5 CAP (standar internal) + 0,6 ml air ultra pure ----- Sebagai Spike sampel untuk kurva kalibrasi pada konsentrasi 0.05, 0.1, 0.2 dan 0.3 µg/l.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Langkah tersebut diatas secara rinci tersaji pada tabel berikut :

Larutan Spike CAP dalam Air Ultra pure (ppb)	Volume Larutan Spike (µg)	Volume D-5 CAP(µg)	Volume air *ultra pure* (µg)	Konsentrasi spike sample pada kurva kalibrasi (ppb)
Blank Sampel (0.0)	0	200	800	0
0.5	200	200	600	0.05
1.0	200	200	600	0.10
2.0	200	200	600	0.20
3.0	200	200	600	0.30

c) Campurkan atau homogenkan, setelah itu diamkan selama 10 menit.
d) Lakukan langkah seperti pada metode kerja preparasi sampel tahap 3 s.d 16.

D.3.2.2 Preparasi sampel

a) Homogenkan 10 g sampel dengan blender,tambahkan 1 ml larutan standar internal.
b) Timbang sampel sebanyak 5 g dalam tabung sentrifuse.
c) Ekstrak sampel dengan 6 ml ethyl asetat.
d) Ulangi ekstraksi di atas, dan gabungkan ethyl asetat hasil ekstraksi.
e) Evaporasi dengan nitrogen evaporator hingga mengdapatkan fase kering.
f) Tambahkan 1 ml acetonitril/toluene (20/80 : v/v), kemudian kocok hingga tercampur.
g) Siapkan silica cartridge (C18), lalu cuci dengan 5 ml acetone/toluene (20/80). Buang seluruh cairan pencuci.
h) Masukkan sampel ke dalam C18. Buang cairan sampel.
i) Cuci kembali silica cartridge dengan 3 ml acetone/toluene (20/80), sebanyak 2 kali.
j) Elusi sampel dengan 6 ml acetone/toluene (65/35) (tampung eluate dalam vial baru).
k) Keringkan dengan nitrogen evaporator.

D.3.2.3 Derivatisasi

a) Larutkan residu kering dalam 100 µl MSTFA/acetonitrile (2/3).
b) Inkubasi selama 1 jam pada suhu 60 °C dalam incubator.
c) Keringkan dengan nitrogen evaporator.
d) Larutkan kembali dengan 50 µl heptanes.
e) Masukkan sampel ke dalam vial GC.

D.4 GC-MS *confirmation*

a) Sampel akan diukur dengan menggunakan GC-MS atau GC-MSMS dengan source ionisasi: Negatif Chemical Ion (NCI) dengan gas helium sebagai gas pembawa dan methane sebagai reagent gas untuk MSMS.
b) Massa yang digunakan (m/z) 376, 378, 466, 468 untuk CAP and 471 untuk chloramphenicol-d5.
c) GC column – panjang: 30 m, ID: 0,25 mm, film thickness: 0,25 µm, phase: Methyl/5 % phenylsilicon (DB-5).

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Lampiran E
(normatif)
Penetapan residu antibiotik nitrofuran dan derivatnya dengan menggunakan metode kromatografi cair tandem massa spektrometri (LC-MSMS)

E.1 Prinsip

Metode ini terbagi dalam 3 tahapan :
a) Hidrolisis dan derivatisasi.
b) Pemurnian bahan yang sudah diekstrak dengan pemisahan cair-cair.
c) Perhitungan dan identifikasi pada system LC-MSMS.

E.2 Pereaksi

a) Standar Nitrofuran.
b) Standar Internal (5-IS).
c) Larutan atau bahan kimia pereaksi murni.

E.3 Peralatan

a) Tabung sentrifuse.
b) Vortex.
c) Nitrogen Evaporator.
d) Sentrifuse.
e) Inkubator.

E.4 Cara kerja

E.4.1 Larutan standar

a) Pembuatan larutan baku kerja : Larutkan sejumlah Nitrofuran (AOZ; AMOZ; SEM; AHD) untuk konsentrasi akhir 10 mg/l (ppb) dengan cara menimbang seksama 1,0 mg baku dan dilarutkan serta diencerkan dengan Methanol hingga 100,0 ml;
b) Pembuatan larutan standar internal (5IS= d4-AOZ; d5-AMOZ; $^{13}C_3$-AHD; $^{13}C^{15}N_2$-SEM) yang setara dengan 100 µg/l (ppb)

E.4.2 Preparasi sampel

a) Timbang 1 g sampel ke dalam tabung sentrifuse
b) Tambahkan 50 µl larutan standar internal dan 0,4 ml air ultra pure
c) Tambahkan 0.5 ml 1M HCL dan 150 µL 50 mM Methanolic 2 nitrobenzaldehyde (189 mg 2 nitrobenzaldehyde larutkan dengan methanol 25 ml dalam labu ukur).
d) Vortex selama 10 menit dan inkubasi pada suhu +37 °C selama 16 jam (1 malam) atau +55 °C selama 4 jam dan lindungi dari cahaya.
e) proses neutralisasi yaitu dengan cara menambahkan 5 ml 0,1M di-potassium hydrogenophosphate (K_2HPO_4) yang diikuti dengan 300 µL 1M NaOH
f) Kocok tabung selama beberapa menit, periksa pH pada nilai 7.0+0.5 dengan pH lakmus dan tambahkan sedikit demi sedikit NaOH jika pH kurang dari 7.
g) Selanjutnya adalah tahap Liquid-liquid Extraction, dengan menambahkan 5 ml ethylasetat.
h) Homogenkan selama 20 menit dalam rotary homogenizer pada kecepatan 100 rd/mnt.
i) Sentrifuse selama 10 menit pada kecepatan 3 000 g dalam 4 °C.
j) Transfer Phase ethylasetat ke dalam vial baru.
k) Ulangi pengerjaan Liquid-liquid ekstraktion dengan menambahkan 3 ml ethylasetat.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

l) Homogenkan selama 20 menit dalam rotary homogenizer pada kecepatan 100 rd/mnt.
m) Sentrifuse selama 10 menit pada kecepatan 3 000 g dalam 4 °C.
n) Transfer dan gabungkan Phase ethylasetat ke dalam vial yang sama (total volume 8 ml). 8 ml ethyl asetat yang diambil tersebut merupakan volume yang berisi residu derivate nitrophenil pada metabolit nitrofuran.
o) Keringkan larutan dengan nitrogen evaporator pada suhu 45°C.
p) Larutkan residu kering dengan 400 µl methanol/1 mM ammonium formiate (60/40; v/v).
q) Transfer hasil ekstraksi ke dalam tabung effendorf dan ultra centrifus pada 19 200 g selama 20 menit pada suhu 4+1°C.
r) Kemudian supernatant di saring dengan menggunakan saringan PVDF 0,45 µm.
s) Pindahkan 300 µl filtrate ke dalam vial LC.

E.4.3 Fortifikasi

a) Timbang 1 g sampel ke dalam tabung sentrifuse.
b) Tambahkan :
- 50 µl larutan standar internal 100 ppb (5IS) + 0,95 ml air ----- Sebagai Blank Sampel.
- 50 µl larutan standar 50 µg/l, 100 µg/l, 150 µg/l dan 200 µg/l + 50 µl larutan 5IS (5 standar internal)+ sejumlah air hingga volume 1 ml ----- Sebagai Spike sampel pada konsentrasi 0.5, 1.0, 1.5 dan 20 µg/Kg.
- Langkah tersebut diatas secara rinci tersaji pada tabel.

Volume Spike 10 ppb dalam Methanol (ppb)	Volume Internal Standar 100 ppb (µg)	Volume air *ultra pure* (µg)	Konsentrasi spike sample pada kurva kalibrasi (ppb)
Blank Sampel (0.0)	50	950	0
50	50	900	0,5
100	50	850	1,0
150	50	800	1,5
200	50	750	2,0

c) Campurkan atau homogenkan, setelah itu diamkan selama 15 menit.
d) Lakukan langkah seperti pada metode kerja preparasi sampel tahap 3 s.d 19.

E.5 LC-MSMS *confirmation*

a) *Mobile Phase*
- 0.5 mM Ammonium Asetat/MeOH

b) *Kromatografi*
- HPLC Pump
- Automatic Injector
- Column : Water Symmetry C 18 150 x 2 mm internal diameter

c) *Mass Spectrometry*
- ESI Interfase (Applied Biosytem)
- Mass Spectrometer API 4000 (Apllied Biosytem)
- Data station

d) *LC Conditions*
- Flow rate 0,2 ml/
- Eluant : ammonium acetate 0,5 M/MeOH
- Gradient :
 - T= 0 : 76/24 eluant
 - T= 5 mnt : 40/60
 - T= 11 mnt : 40/60
 - T= 11.5 mnt : 76/24
- Volume yang diinjek 25 µl

© BSN 2013

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

e) Source *conditions*
- Nebulizer gas (N2) pressure: 80 l/menit
- Source temperature : 150 °C
- Disolvation gas (N2) pressure : 770 l/mnt
- Nebulizer Temperatur : 350 °C
- CID gas pressure (Argon) : 2.2 10^{-3} mbar

f) *Mass* Spectrometer *condition*
- Ionisation mode : ESI positif
- Detetction mode : MRM

Analit	Precursor	Product
NP-SEM	209	169; 166
NP-AOZ	236	134;104
NP-d4 AOZ	240	134
NP-AHD	249	178;134
NP-AMOZ	335	291;262
NP-d5 AMOZ	340	296

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Lampiran F
(normatif)
Penetapan kadar melamin dengan menggunakan metode ELISA

Tes ini berdasarkan adanya ikatan antibodi melamin. Ekstrak sampel dan HRP conjugate melamin dipipet dan dimasukkan ke dalam well yang telah dilapisi antibodi melamin untuk memulai reaksi. Selama masa inkubasi, melamin dari sampel dan HRP conjugate berkompetisi untuk mengikat antibodi melamin pada well. Setelah pencucian, substrat ditambahkan kedalam well dan mengikat beberapa enzyme konjuga hingga menyebabkan perubahan warna menjadi biru. Konsentrasi melamin pada sampel ditentukan oleh interpolasi kurva standar yang terbentuk pada saat pembacaan.

F.1 Peralatan

a) *mikrotiter plate reader* (450 nm);
b) neraca analitik;
c) *blender* (*homogenizer*);
d) *Sonikator*;
e) *sentrifus*;
f) Tabung *mikrosentrifus;*
g) *vortex*;
h) mikropipet;
i) multi*channel* pipet.

F.2 Pereaksi

a) Melamin kompetitor dalam *mikrotiter plate* (48 *well plate*);
b) standar melamin 0.00 µg/kg; 20 µg/kg; 50 µg/kg; 100 µg/kg; 200 µg/kg dan 500 µg/kg;
c) *melamin HRP conjugate* ;
d) Substrat;
e) *stop solution*;
f) melamin antibody #1;
g) *washing solution*;
h) methanol;
i) air destilasi;
j) PBS Buffer.

F.3 Cara kerja

F.3.1 Pembuatan pereaksi

a) Preparasi 1 x wash solution.
Campurkan 1 volume 5x wash solution dengan 4 volume air destilasi.
b) 20 mM PBS buffer : 0,48 g KH_2PO_4 + 2.88 g Na2HPO4 + 0,4 g KCl + 16 g NaCl, larutkan dalam 1000 ml air destilasi, pH 7,4.

F.3.2 Preparasi sampel:

a) Homogenkan sample dengan blender atau sejenisnya.
b) Timbang 1 gr sample.
c) Tambahkan 10 ml (10 % Methanol/20 mM PBS, pH 7,2 – 7,4).
d) Sonikasi sampel dalam sonikator selama 1-2 menit atau vorteks selama 1-2 menit.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

e) Biarkan sampel selama 3-5 menit, kemudian pindahkan 1 ml sampel ke dalam tabung mikrosentrifus (catatan : sampel terbagi atas 3 lapisan, ambil sampel yang terdapat pada lapisan tengah).
f) Sentrifus sample pada 10.000-13.000 x g selama 2-3 menit pada suhu ruang (20 ºC - 25 ºC).
g) Tuangkan supernatant kedalam vial baru.
h) Larutkan supernatan 1:10 (1+9) dengan 10 % Methanol/20 mM PBS (contoh; 100 µL ekstrak sampel dilarutkan dengan 900 µL 10 % Methanol/20 mM PBS.
i) Gunakan 100 µL untuk setiap well pengujian.

CATATAN *Dillution factor* 100

F.4 Prosedur pengujian ELISA:

a) Tambahkan 100 µL pada masing-masing *well* yang berbeda, standar melamin sebanyak 2 ulangan (pemberian standar pada *plate* berurutan dari konsentrasi yang rendah sampai yang tinggi).
b) Tambahkan 100 µL sampel pada masing-masing *well* sampel.
c) Tambahkan 50 µL enzim konjugat dan aduk dengan menggoyangkan *plate* selama 1 menit.
d) Inkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan (20 °C– 25 °C).
e) Cuci *plate* sebanyak 3 kali ulangan dengan 250 µL 1 x *wash solution*. Setelah pencucian, balikan '*plate*' dan ketuk pelan-pelan pada kertas tisu kering (lakukan langkah berikutnya, segera setelah pencucian).
f) Tambahkan 100 µL TMB Substrat. Reaksi terjadi sesaat setelah penambahan substrat. Aduk larutan dengan menggoyangkan *plate* dengan pelan selama 1 menit sebelum inkubasi.
g) Setelah inkubasi selama 20 menit pada suhu ruang, tambahkan 100 µL *stop buffer* untuk menghentikan reaksi enzim.
h) Pembacaan 'plate' segera setelah penambahan *stop buffer*. Pembacaan dilakukan pada *plate reader* dengan panjang gelombang 450 nm.

CATATAN Semua reagent sebelum digunakan harus disimpan terlebih dahulu di suhu ruang selama 1 jam -2 jam.

F.5 Perhitungan

Membuat kurva standar dengan memplotkan (menghubungkan) nilai rata-rata *relative absorbance* (%) yang diperoleh atau dari referensi standar lain yang berbading terbalik dengan konsentrasi dalam ppb pada kurva *logarithmic*.

$$\text{Relative absorban (\%)} = \frac{\text{Absorban standar (atau sample) x 100}}{\text{Absorban zero standar}}$$

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Lampiran G
(normatif)
Penetapan aflatoksin dengan menggunakan metode ELISA

G.1 Prinsip

Metode ini berdasarkan pengujian ELISA kompetitif colorimetric untuk mendeteksi Aflatoksin yang terdapat pada sampel. Mikrotiter wells dilapisi dengan antigen yang akan berikatan dengan antibody aflatoksin. Selama pengujian, pada sampel ditambahkan antibody primer yang spesifik untuk aflatoksin. Jika antibody aflatoksin tersebut terdapat pada sampel, maka akan terjadi kompetisi antara antibodi pada sampel dengan yang ditambahkan, untuk mencegah terjadinya ikatan dengan antigen yang terdapat pada wells. Antibodi sekunder yang mengandung enzyme peroxidase adalah sebagai penanda.Intensitas warna yang dihasilkan setelah penambahan substrat akan berbanding terbalik dengan konsentrasi analit di dalam sample.

G.2 Peralatan

a) mikrotiter *plate reader* (450 nm);
b) neraca analitik;
c) sentrifus;
d) inkubator;
e) *blender* (Homogenizer);
f) *rotary evaporator*;
g) vortex;
h) pipet 10, 20, 100 dan 1000 µL;
i) multi*channel* pipet.

G.3 Pereaksi

a) Aflatoksin *antibodi* dalam mikrotiter *plate* (96 *well plate*).
b) Standar aflatoksin :0 µg/kg, 0.5 µg/kg, 0,1µg/kg, 0.2µg/kg, 0.4µg/kg, 0.8µg/kg.
c) Antibodi #1.
d) 100 X HRP konjugat antibodi #2.
e) Antibodi #2 *diluent*.
f) 20 x *wash solution*.
g) *Stop buffer*.
h) TMB substrat (indikator pewarna).
i) 20 x *sampel extraction buffer*.
j) Methanol 70 %.
k) Air destilasi.

G.4 Cara kerja

G.4.1 Pembuatan pereaksi:

a) Methanol 70%:untuk pembuatan 100 ml; (campurkan 70 ml metanol dengan 30 ml air destilasi).
b) Preparasi 1 x *wash solution* (campurkan 1 volume 20 x *wash solution* dengan 19 volume air destilasi.
c) Preparasi 1 x HRP konjugat antibodi #2 (campurkan 1 volume 100 x HRPkonjugat antibodi #2 dengan 99 volume antibodi #2 *diluent*.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

G.4.2 Preparasi sampel : Pakan

a) Homogenkan sampel dengan blender atau sejenisnya.
 - Timbang 5 gram sampel.
b) Tambahkan 25 ml methanol 70 %, *vortex* selama selama inkubasi. 3 menit.
c) Sentrifus pada kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang (20 °C – 25 °C).
d) Gunakan 50 µL per *well* untuk pengujian.

CATATAN *Dillution factor* 10,0

G.4.3 Penggunaan mesin ELISA

a) Tambahkan 50 µL pada masing-masing *well* yang berbeda, standar aflatoxin sebanyak 2 ulangan (pemberian standar pada *plate* berurutan dari konsentrasi yang rendah sampai yang tinggi).
b) Tambahkan 50 µL sampel pada masing-masing *well* sampel.
c) Tambahkan 100 µL antibodi #1 dan aduk dengan menggoyangkan *plate* denganpelan selama 1 menit.
d) Inkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan (20 °C – 25 °C).
e) Cuci *plate* sebanyak 3 kali ulangan dengan 250 µL 1 x *wash solution*. Setelah pencucian, balikan *plate* dan ketuk pelan-pelan pada kertas tisu kering (lakukan langkah berikutnya, segera setelah pencucian).
f) Tambahkan 150 µL 1 x antibodi #2 *solution*. Inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang (hindari sinar cahaya langsung dan suhu dingin selama inkubasi. Tutup mikrotiter *plate* dengan penutup yang direkomendasikan, selama inkubasi).
g) Cuci *plate* sebanyak 3 kali ulangan dengan 250 µL 1 x *wash solution*. Setelah pencucian, balikan *plate* dan ketuk pelan-pelan pada kertas tisu kering (lakukan langkah berikutnya, segera setelah pencucian).
h) Tambahkan 100 µL TMB Substrat. Reaksi terjadi sesaat setelah penambahan substrat. aduk larutan dengan menggoyangkan *plate* dengan pelan selama 1 menit sebelum inkubasi.
i) Setelah inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang, tambahkan 100 µL *stop buffer* untuk menghentikan reaksi enzim.
j) Pembacaan *plate* segera setelah penambahan *stop buffer*. Pembacaan dilakukan pada *plate reader* dengan panjang gelombang 450 nm.

CATATAN Semua *reagen* sebelum digunakan harus disimpan terlebih dahulu di suhu ruang selama 1 jam -2 jam.

G.5 Perhitungan

a) Membuat kurva standar dengan memplotkan (menghubungkan) nilai rata-rata relatif absorban(%) yang diperoleh atau dari referensi standar lain.

$$\text{Relatif absorban (\%)} = \frac{\text{Absorban standar (atau sampel) x 100}}{\text{Absorban zero standar}}$$

b) Nilai konsentrasi aflatoksin pada sampel (dalam µg/kg) diperoleh dari memplotkan nilai relatif absorban pada kurva *logaritmic* larutan standar yang berbanding terbalik dengan konsentrasi aflatoksin dalam µg/kg.
c) Konsentrasi aflatoksin dapat terdeteksi diatas LOD.
d) Perhitungan LOD (*limit of detection*) dan LOQ l*Limit of quantification*) sampel :
 Sampel *detection limit* = (0,025 ng/g atau µg/kg) x (*dilution factor*);
 Sampel *quantification limit* = (5 ng/g atau µg/kg) x (*dilution factor*).

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Bibliografi

Bio Scientific Corp, 2008.*Aflatoksin ELISA Test Kit Manual.*

Cruz PS. 1996, Feed Quality Problem and Management Strategies,pp 64-73. In: Santiago CB.Coloso RM.Millamena OM, Borlongan EG (eds) Feed for Small-Scale Aquaculture. Proceedingof the National Seminar-Workshop on Fish Nutrisi and Feeds; SEAFDEC Aquaculture Departement.

Fish Nutrition and Mariculture. JICA Textbook The General Aquaculture course. Edited by Watanabe.Departemen of Aquatic Biosciences Tokyo University of Fisheries.

PeraturanMenteri Kelautan dan Perikanan Nomor. PER.02/MEN/2010 tentang *Pengadaan dan Peredaran Pakan Ikan*.

Principle of Fish Nutrition, Werner Steffens, 1989. Ellis Horwood Limited. John Wile & Sons.New York-Chichester-Brisbane-Toronto.

Nutrition in Tropical Aquaculture.Essentials of Fish Nutrition, Feeds, and Feeding of Tripical Aquatic Spesies.Edited by Oseni M. Millamena, Relicardo M. Coloso, and Felicitas P. Pascual. Aquaculture Departement.Souteast Asian Fisheries Development Center. Tigbauan, Iloilo, Philippines May 2002.

Charles Yang and Dipankar Ghosh.*LC-MS/MS Analysis of Malachite Green,Leucomalachite Green, Ciprofloxacin, andTetracycline in Food Samples using aTurboFlow Method. Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA.*

Bernard Delepine. *Chloramphenicol Identification By Liquid Chromatography Tandem Mass-Spectrometry.* AFSSA- Fougeres. France. June 2004.

Mikael Pedersen, Vera Klausen and Lars-Peter Olesen.*Confirmation of Chloramphenicol in Tissue, Milk and Honey by GC-MS*.The Danish Veterinary and Food Administration Institute of Food Safety and Nutrition. Denmark.

Verdon Eric, Pierrick Couedor, Pascal Sanders. "*Multi residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, nitrofurantoine, nifursol) in poultry muscle tissue through the detection of their five major metabolites (AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DNSAH) by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry-in house validation with Commission Decision 657/2002/EC*. Elseiver.2007.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"